

PROTEIN-EXPRESSING SYSTEM THAT USES PLANT BODY

Publication number: JP2002272476 (A)

Publication date: 2002-09-24

Inventor(s): TOMIZAWA KENICHI; YOKOTA AKIO +

Applicant(s): RES INST INNOVATIVE TECH EARTH +

Classification:

- international: **A01H5/00; C07K14/415; C12N15/09; C12N5/10; A01H5/00; C07K14/415; C12N15/09; C12N5/10; (IPC1-7): A01H5/00; C07K14/415; C12N15/09; C12N5/10**

- European:

Application number: JP20010083569 20010322

Priority number(s): JP20010083569 20010322

Abstract of **JP 2002272476 (A)**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a vector for expressing a protein using a plant body. **SOLUTION:** A vector having (a) a pre-construction gene cluster having a multi-cloning region having a ribosome-binding region in the upstream of restriction enzyme sites, an insertion site that permits inserting a gene encoding a protein placed between two restriction enzyme sites and a ribosome-binding site in the upstream of the insertion site, a promoter in the upstream of the multi-cloning region and a terminator in the downstream of the multi-cloning region and (b) an identification gene cluster having genes for identifying a genetic recombinant, a promoter in the upstream of the gene and a terminator in the downstream of the gene in the upstream of the pre-construction gene cluster, are provided.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/415		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		5/00	C 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2001-83569(P2001-83569)	(71) 出願人	591178012 財団法人地球環境産業技術研究機構 京都府相楽郡木津町木津川台 9 丁目 2 番地
(22) 出願日	平成13年 3 月22日 (2001. 3. 22)	(72) 発明者	富澤 健一 京都府相楽郡木津町木津川台 9 - 2 地球 環境産業技術研究機構
		(72) 発明者	横田 明穂 京都府相楽郡木津町木津川台 9 - 2 地球 環境産業技術研究機構
		(74) 代理人	100077012 弁理士 岩谷 龍

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物体を用いたタンパク質発現系

(57) 【要約】

【課 題】 本発明は、植物体を用いたタンパク質発現ためのベクターを提供すること目的とする。

【解決手段】 (a) 複数の制限酵素部位、2つの制限酵素部位に挟まれたタンパク質をコードする遺伝子を挿入できる挿入部位および該挿入部位の上流にリボゾーム結合部位を有するマルチクローニング領域と、マルチクローニング領域の上流にプロモーターと、マルチクローニング領域の下流にターミネーターとを有する構築前遺伝子群と、その上流に (b) 遺伝子組換え体を識別するための遺伝子、その上流にプロモーターおよびその下流にターミネーターを有する識別遺伝子群とを有することを特徴とするベクター。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 複数の制限酵素部位、2つの制限酵素部位に挟まれたタンパク質をコードする遺伝子を挿入できる挿入部位および該挿入部位の上流にリボゾーム結合部位を有するマルチクローニング領域と、マルチクローニング領域の上流にプロモーターと、マルチクローニング領域の下流にターミネーターとを有する構築前遺伝子群と、その上流に(b) 遺伝子組換え体を識別するための遺伝子、その上流にプロモーターおよびその下流にターミネーターを有する識別遺伝子群とを有することを特徴とするベクター。

【請求項2】 構築前遺伝子群のマルチクローニング領域が、タンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始点の7～11塩基上流にリボゾーム結合部位を有することを特徴とする請求項1に記載のベクター。

【請求項3】 リボゾーム結合部位がSD配列であることを特徴とする請求項1または2に記載のベクター。

【請求項4】 構築前遺伝子群のマルチクローニング領域が、配列番号7で表される塩基配列からなることを特徴とする請求項1～3に記載のベクター。

【請求項5】 構築前遺伝子群のプロモーターおよびターミネーターまたは／および識別遺伝子群のプロモーターおよびターミネーターが、葉緑体由来のプロモーターおよびターミネーターであることを特徴とする請求項1～4に記載のベクター。

【請求項6】 葉緑体由来のプロモーターおよびターミネーターが、タバコ葉緑体由来のプロモーターおよびターミネーターであることを特徴とする請求項5に記載のベクター。

【請求項7】 タバコ葉緑体由来のプロモーターが、タバコ葉緑体由来のpsbAプロモーターまたはrrnプロモーターであることを特徴とする請求項6に記載のベクター。

【請求項8】 タバコ葉緑体由来のターミネーターが、タバコ葉緑体由来のpsbAターミネーターまたはrps16ターミネーターであることを特徴とする請求項6または7に記載のベクター。

【請求項9】 構築前遺伝子群のプロモーターが、タバコ葉緑体由来のpsbAプロモーターであることを特徴とする請求項6に記載のベクター。

【請求項10】 構築前遺伝子群のプロモーターがタバコ葉緑体由来のpsbAプロモーターであり、構築前遺伝子群のターミネーターがタバコ葉緑体由来のrps16ターミネーターであり、識別遺伝子群のプロモーターがタバコ葉緑体由来のrrnプロモーターであり、識別遺伝子群のターミネーターがタバコ葉緑体由来のpsbAターミネーターである請求項6に記載のベクター。

【請求項11】 ベクターpLD6 (FERM P-18260)。

【請求項12】 請求項1～11に記載のベクターにタ

ンパク質をコードする遺伝子が挿入されている遺伝子組み換え体。

【請求項13】 複数の制限酵素部位を有するポリリンカーと、その上流にタバコ葉緑体由来のrbcL遺伝子と、その下流にタバコ葉緑体由来のaccD遺伝子を有することを特徴とするベクター。

【請求項14】 ポリリンカーが配列番号9で表される塩基配列からなることを特徴とする請求項13に記載のベクター。

【請求項15】 配列番号8の396-3328に位置する塩基配列からなる遺伝子を有することを特徴とする請求項14に記載のベクター。

【請求項16】 ベクターpLD200 (FERM P-18261)。

【請求項17】 請求項12に記載の遺伝子組換え体の、(a) 複数の制限酵素部位、タンパク質をコードする遺伝子および該遺伝子の上流にリボゾーム結合部位を有するマルチクローニング領域と、マルチクローニング領域の上流にプロモーターと、マルチクローニング領域の下流にターミネーターとを有する構築遺伝子群と、その上流にある(b) 遺伝子組換え体を識別するための遺伝子、その上流にプロモーターおよびその下流にターミネーターを有する識別遺伝子群とが、請求項13～16に記載のベクターに挿入されていることを特徴とする発現ベクター。

【請求項18】 請求項17に記載の発現ベクターを葉緑体に導入した形質転換葉緑体。

【請求項19】 葉緑体がタバコ葉緑体である請求項18に記載の形質転換葉緑体。

【請求項20】 請求項18または19に記載の形質転換葉緑体を有する植物。

【請求項21】 植物がタバコである請求項20に記載の植物。

【請求項22】 請求項20または21に記載の植物から得られるタンパク質。

【請求項23】 pLD6のマルチクローニング領域のSphIとEcoRIに挟まれた部位に、タンパク質をコードする遺伝子を挿入して遺伝子組換え体を作製し、ついで遺伝子組換え体をクローニングした後、該遺伝子組換え体からNotIおよびSalIを用いて構築遺伝子と識別遺伝子とを有する遺伝子を切り出し、該切り出した遺伝子をpLD200のポリリンカーのNotIとSalIに挟まれた部位に挿入することを特徴とする発現ベクターの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、植物体を用いたタンパク質発現系に関する。

【0002】

【従来の技術】医薬品等として利用できる有用タンパク

質を遺伝子組換えを利用して大量調製する場合、これまでは大腸菌を用いた系が広く利用されてきた。この場合、発現したタンパク質の精製過程での毒素の混入が考えられたため、このような場合動物細胞の利用が実用化されている。しかしながら動物細胞を利用する際の培養にかかるコストは、大腸菌の場合の数十倍にも及び、このため得られた製品（タンパク質）が高価なものとなっている。この点、植物は光合成により生育するため、エネルギーの投入が少なく、製品（タンパク質）が安価になり得る。実際、遺伝子組換え産物を得るための宿主として、その製品単価を比較した場合、動物細胞、大腸菌、植物体の順に安くなることが試算されている。このため、植物体を用いた有用タンパク質の大量発現系の開発が熱望されていた。

【0003】高等植物の葉緑体は、成葉1細胞あたり100個程度存在し、葉緑体1個あたり100コピーの葉緑体ゲノム遺伝子が存在する（Bendich, A.J., Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *Bioassays*, 6, 279-282 (1987)）。このことは、もし1コピーの外来遺伝子を葉緑体ゲノムに挿入した場合、形質転換体においては細胞あたり1万コピー存在することになり、コピー数の多さから高発現が期待できる（Maliga, P., Towards plastid transformation in flowering plants. *Trends Biotechnol.* 11, 101-107 (1993)）。さらに、葉緑体への遺伝子導入は相同組み換えを利用するため、核への挿入時に見られる位置効果がおこらず、安定した遺伝子発現が行われる。また、葉緑体は母性遺伝をするため、導入した遺伝子の花粉を介した環境への飛散を防ぐことができる等、葉緑体への遺伝子導入は利点が多い（上記文献参照）。

【0004】葉緑体形質転換手法を用い、外来タンパク質の過剰発現はこれまで *Bacillus* の作り出す毒素（McBride, K.E., Svab, Z., Schaaf, D.J., Hogan, P.S., Stalker, D.M. and Maliga, P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/technol.*, 13, 362-365、または、Kota, M., Daniell, H., Varma, S., Garczynski, S.F., Gould, F., and Moar, W.J., Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1840-1845 (1999)）、除草剤（Daniell, H., Datta, R., Varma, S., Gray, S., and Lee, S.-B., Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnol.* 16, 345-348. (1998)）について試みられているが、これらの場合、形質転換体の選抜のための *aadA* 遺伝子とのポリシストロニックな遺伝子発現を狙ったた

め、その発現総量は全可溶画分の6～7%程度であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、植物体を用いたタンパク質発現ためのベクターを提供することとする。本発明は、また、目的タンパク質を葉緑体において高度に発現させることができる発現ベクター、および該発現ベクターを用いて形質転換させた形質転換葉緑体、さらには該形質転換葉緑体を有する植物を提供することを目的とする。さらに、上記発現ベクター作製のために有用なベクターを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、植物体を用いたタンパク質発現系、とくに葉緑体を用いたタンパク質発現系について鋭意検討した結果、タンパク質をコードする遺伝子上流にタバコ葉緑体由来の *p sbA* プロモーターを導入することにより、導入した上記遺伝子がコードするタンパク質をタバコ葉緑体において高発現させることができるという思いがけない知見を得た。さらに、導入した遺伝子がコードするタンパク質の発現量を増加させるべく検討した結果、タンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始点上流にリボゾーム結合部位を置くことにより導入した遺伝子がコードするタンパク質の発現量がさらに増加するという思いがけない知見を得た。本発明者らは、植物体でのタンパク質発現系についてさらに検討を重ね、本発明を完成した。

【0007】すなわち、本発明は、（1）（a）複数の制限酵素部位、2つの制限酵素部位に挟まれたタンパク質をコードする遺伝子を挿入できる挿入部位および該挿入部位の上流にリボゾーム結合部位を有するマルチクローニング領域と、マルチクローニング領域の上流にプロモーターと、マルチクローニング領域の下流にターミネーターとを有する構築前遺伝子群と、その上流に（b）遺伝子組換え体を識別するための遺伝子、その上流にプロモーターおよびその下流にターミネーターを有する識別遺伝子群とを有することを特徴とするベクター、

（2）構築前遺伝子群のマルチクローニング領域が、タンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始点の7～11塩基上流にリボゾーム結合部位を有することを特徴とする前記（1）に記載のベクター、（3）リボゾーム結合部位がSD配列であることを特徴とする前記（1）または（2）に記載のベクター、（4）構築前遺伝子群のマルチクローニング領域が、配列番号7で表される塩基配列からなることを特徴とする前記（1）～（3）に記載のベクター、（5）構築前遺伝子群のプロモーターおよびターミネーターまたは／および識別遺伝子群のプロモーターおよびターミネーターが、葉緑体由来のプロモーターおよびターミネーターであることを特徴とする前記

（1）～（4）に記載のベクター、（6）葉緑体由来のプロモーターおよびターミネーターが、タバコ葉緑体由

来のプロモーターおよびターミネーターであることを特徴とする前記(5)に記載のベクター、(7)タバコ葉緑体由来のプロモーターが、タバコ葉緑体由来のp s b Aプロモーターまたはr r nプロモーターであることを特徴とする前記(6)に記載のベクター、(8)タバコ葉緑体由来のターミネーターが、タバコ葉緑体由来のp s b Aターミネーターまたはr p s 1 6ターミネーターであることを特徴とする前記(6)または(7)に記載のベクター、(9)構築前遺伝子群のプロモーターが、タバコ葉緑体由来のp s b Aプロモーターであることを特徴とする前記(6)に記載のベクター、(10)構築前遺伝子群のプロモーターがタバコ葉緑体由来のp s b Aプロモーターであり、構築前遺伝子群のターミネーターがタバコ葉緑体由来のr p s 1 6ターミネーターであり、識別遺伝子群のプロモーターがタバコ葉緑体由来のr r nプロモーターであり、識別遺伝子群のターミネーターがタバコ葉緑体由来のp s b Aターミネーターである前記(6)に記載のベクター、(11)識別遺伝子群の遺伝子組換え体を識別するための遺伝子がスペクチノマイシン耐性遺伝子であることを特徴とする前記(1)～(10)に記載のベクター、(12)識別遺伝子群の遺伝子組換え体を識別するための遺伝子が配列番号3で表される塩基配列を有するa a d A遺伝子であることを特徴とする前記(1)～(10)に記載のベクター、(13)ベクターp L D 6 (FERM P-18260)、(14)前記(1)～(13)に記載のベクターにタンパク質をコードする遺伝子が挿入されている遺伝子組み替え体、(15)複数の制限酵素部位を有するポリリンカーと、その上流にタバコ葉緑体由来のr b c L遺伝子と、その下流にタバコ葉緑体由来のa c c D遺伝子を有することを特徴とするベクター、(16)ポリリンカーが配列番号9で表される塩基配列からなることを特徴とする前記(15)に記載のベクター、(17)配列番号8の396-3328に位置する塩基配列からなる遺伝子を有することを特徴とする(15)または(16)に記載のベクター、(18)ベクターp L D 200 (FERM P-18261)、(19)前記(14)に記載の遺伝子組換え体の、(a)複数の制限酵素部位、タンパク質をコードする遺伝子および該遺伝子上流にリボゾーム結合部位を有するマルチクロニング領域と、マルチクロニング領域の上流にプロモーターと、マルチクロニング領域の下流にターミネーターとを有する構築遺伝子群と、その上流にある(b)遺伝子組換え体を識別するための遺伝子、その上流にプロモーターおよびその下流にターミネーターを有する識別遺伝子群とが、前記(15)～(18)に記載のベクターに挿入されていることを特徴とする発現ベクター、(20)前記(19)に記載の発現ベクターを葉緑体に導入した形質転換葉緑体、(21)葉緑体がタバコ葉緑体である前記(20)に記載の形質転換葉緑体、(22)前

記(20)または(21)に記載の形質転換葉緑体を有する植物、(23)植物がタバコである前記(22)に記載の植物、(24)前記(22)または(23)に記載の植物から得られるタンパク質、(25)p L D 6のマルチクロニング領域のS p h IとE c o R Iに挟まれた部位に、タンパク質をコードする遺伝子を挿入して遺伝子組換え体を作製し、ついで遺伝子組換え体をクローニングした後、該遺伝子組換え体からN o t IおよびS a l Iを用いて構築遺伝子と識別遺伝子とを有する遺伝子を切り出し、該切り出した遺伝子をp L D 200のポリリンカーのN o t IとS a l Iに挟まれた部位に挿入することを特徴とする発現ベクターの製造方法、に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明に係るベクターは、クローニングベクターに、構築前遺伝子群と識別遺伝子群とを挿入することにより作製することができる。ここで、本発明で用いることができるクローニングベクターは、

(a) 構築前遺伝子群と識別遺伝子群とを挿入することができる制限酵素部位を持ち、(b) 宿主細胞に導入することができる、(c) 宿主細胞内で増殖する能力をもち、(d) クローニングベクターが導入され形質転換された宿主細胞を特異的に検出することができれば特に限定されず、自体公知のものを用いてよい。具体的には、該クローニングベクターとしては、プラスミド、ファージ、コスミドまたはファージミドなどが挙げられ、より具体的には、大腸菌由来のプラスミド(例えば、p B R 322, p B R 325, p U C 12など)、枯草菌由来のプラスミド(例えば、p U B 110, p T P 5, p C 194など)、酵母由来プラスミド(例えば、p S H 19, p S H 15, p Y E S 2など)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルスなどが挙げられる。また、市販のクローニングベクターを用いてよい。

【0009】上記クローニングベクターに挿入する構築前遺伝子群は、マルチクロニング領域と、マルチクロニング領域の上流にあるプロモーターと、マルチクロニング領域の下流にあるターミネーターとを有する。該マルチクロニング領域は、複数の制限酵素部位と、2つの制限酵素部位に挟まれたタンパク質をコードする遺伝子を挿入する挿入部位と、該挿入部位の上流にリボゾーム結合部位を有する。このように、タンパク質をコードする遺伝子を挿入する挿入部位の上流にリボゾーム結合部位をおくことにより、該タンパク質を高度に発現させることができるという利点がある。該リボゾーム結合部位はタンパク質をコードする遺伝子の翻訳開始点の約7～11塩基程度上流にあることがより好ましく、9塩基程度上流にあることがさらに好ましい。かかるリボゾーム結合部位は、リボゾームが結合できることが知られている自体公知の塩基配列を有していればよいが、S D配列が好ましい。S D配列は、Shine-Dalgarno seque

nceの略称であり、4～7個のヌクレオチドからなるセグメントであって、その塩基配列は5'-AGGAGGU-3'の一部または全部である。該マルチクロニング領域の最も好ましい態様として、配列番号7に記載した塩基配列を有する遺伝子が挙げられる。

【0010】上記マルチクロニング領域の上流にあるプロモーターは自体公知のものであってよい。例えば、微生物（エシェリヒア属菌やバチルス属菌などの原核生物、酵母や糸状菌などの真核生物）、植物細胞または動物細胞由来のものが挙げられる。より具体的にはエシェリヒア属菌のtrpプロモーター、trcプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP Lプロモーター、lppプロモーターもしくはT7プロモーターなど；バチルス属菌のSPO1プロモーター、SPO2プロモーターもしくはpenPプロモーターなどが挙げられる。中でも、該プロモーターとしては、葉緑体由来のプロモーターが好ましく、タバコ葉緑体由来のプロモーターがより好ましく、タバコ葉緑体由来のpsbAプロモーターが最も好ましい。なお、タバコ葉緑体由来のpsbAプロモーターの塩基配列を配列番号5に記載した。

【0011】上記マルチクロニング領域の下流にあるターミネーターは自体公知のものであってよい。例えば、微生物（エシェリヒア属菌やバチルス属菌などの原核生物、酵母や糸状菌などの真核生物）、植物細胞または動物細胞由来のものが挙げられる。中でも、該ターミネーターとしては、葉緑体由来のターミネーターが好ましく、タバコ葉緑体由来のターミネーターがより好ましく、タバコ葉緑体由来のrps16ターミネーターが最も好ましい。なお、タバコ葉緑体由来のrps16ターミネーターの塩基配列を配列番号6に記載した。

【0012】本発明においては、上記クロニングベクターに対し、上記構築前遺伝子群の上流に識別遺伝子群を挿入する。該識別遺伝子群は、遺伝子組換え体を識別するための遺伝子、その上流にあるプロモーターおよびその下流にあるターミネーターを有する。上記遺伝子組換え体を識別するための遺伝子としては、特に限定されず、自体公知のものを用いてよい。例えば、各種の薬剤耐性遺伝子、または宿主の栄養要求性を相補する遺伝子などが挙げられる。より具体的には、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子（G418耐性）、クロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、スペクチノマイシン耐性遺伝子、URA3遺伝子等が挙げられる。中でも、本発明においてはスペクチノマイシン耐性遺伝子を用いるのが好ましい。なお、該スペクチノマイシン耐性遺伝子であるaadA遺伝子の塩基配列を配列番号3に記載した。

【0013】上記プロモーターおよびターミネーターとしては、上記構築前遺伝子群で用いるプロモーターおよびターミネーターとして列挙したものなど、自体公知の

ものを用いてよい。中でも、葉緑体由来のプロモーターおよびターミネーターが好ましく、タバコ葉緑体由来のプロモーターおよびターミネーターがより好ましく、タバコ葉緑体由来のrrnプロモーターおよびpsbAターミネーターが最も好ましい。なお、タバコ葉緑体由来のrrnプロモーターの塩基配列を配列番号2に、タバコ葉緑体由来のpsbAターミネーターの塩基配列を配列番号4に記載した。

【0014】上記ベクターには、タンパク質の発現に有利である1または複数の因子、例えばアクティベーター（例えばトランス作用因子）、シャペロンおよびプロセッシングプロテアーゼをコードする1または複数の核酸配列も含み得る。また、本発明に係る上記ベクターは、選択された宿主細胞内で機能的であるいずれかの因子を有していてもよい。

【0015】以上に述べた本発明に係るベクターの最も好ましい態様として、pLD6が挙げられる。かかるベクターは、実施例に記載の方法で容易に作製することができる。また、pLD6プラスミドは、ブタベスト条約に基づいて、平成13年3月19日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県筑波市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）に受託番号FERM P-18260として寄託されている。

【0016】pLD6の模式図を図1に示した。またpLD6の全塩基配列を配列番号1に示した。図1より分かるように、pLD6は、(a)配列番号7で表される塩基配列を有するマルチクロニング領域と、その上流に配列番号5で表されるタバコ葉緑体由来のpsbAプロモーター（配列番号1中の3569-3701に位置する）と、その下流に配列番号6で表されるタバコ葉緑体由来のrps16ターミネーター（配列番号1中の3755-3913に位置する）とからなる構築前遺伝子群と、その上流に(b)遺伝子組換え体を識別するための遺伝子としての配列番号3で表されるスペクチノマイシン耐性遺伝子であるaadA遺伝子（配列番号1中の2368-3173に位置する）と、その上流に配列番号2で表されるタバコ葉緑体由来のrrnプロモーター（配列番号1中の2226-2368に位置する）と、その下流に配列番号4で表されるタバコ葉緑体由来のpsbAターミネーター（配列番号1中の3175-3568に位置する）とを有している。

【0017】上記本発明に係るベクターのマルチクロニング領域に、タンパク質をコードする遺伝子を挿入し、遺伝子組換え体を作製する。例えば、pLD6ベクター場合は、マルチクロニング領域のSphIとEcoRIに挟まれた部位にタンパク質をコードする遺伝子を挿入する。ここで、以下、該遺伝子組換え体において、タンパク質をコードする遺伝子を挿入された上記構築前遺伝子群を構築遺伝子群と称する。該タンパク質は、本発明に係る発現系を用いて発現させたいタンパク

質であり、その種類は特に限定されない。例えば薬理活性を有するタンパク質、医薬品または工業用材料などとして有用なタンパク質を製造するのに必要な酵素などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0018】ついで、上記遺伝子組換え体を適当な宿主細胞に導入し、かかる宿主細胞を培養して、目的の遺伝子をクローニングする。ここで、目的の遺伝子とは、上記構築遺伝子群および識別遺伝子群である（以下も同様である）。宿主細胞は、クローニングベクターに応じて適宜選択でき、具体的には、例えばエシェリヒア属菌やバチルス属菌などの原核生物、酵母や糸状菌などの真核生物、植物細胞または動物細胞等が挙げられる。また、宿主細胞の培養条件は、宿主細胞の種類に応じて当業界で通常行われている条件に従えば良い。また、クローニングされた遺伝子に目的の遺伝子がうまく導入されたか否かは、クローニングベクターが有する選択マーカー等に基づき容易に判別することができる。

【0019】本発明においては、ついで、上記のようにしてクローニングされた遺伝子から、目的の遺伝子またはそれを含む遺伝子を制限酵素を用いて切り出し、本発明に係るもう一つのベクターに挿入し、発現ベクターを作製する。本発明に係るもう一つのベクターとは、複数の制限酵素部位を有するポリリンカーと、その上流にタバコ葉緑体由来の $rbcL$ 遺伝子と、その下流にタバコ葉緑体由来の $accD$ 遺伝子とを有することを特徴とするベクターである。このようにすることにより、外来のタンパク質をコードする遺伝子が、相同組換えにより宿主細胞の染色体DNAに組み込まれやすくなり、さらに該タンパク質の発現量が多くなるという利点がある。ここで、 $rbcL$ 遺伝子のうちの構造遺伝子は配列番号8中の423-1856に位置する。また、 $accD$ 遺伝子のうちの構造遺伝子は配列番号8中の2624-3328に位置する。

【0020】該ベクターのより好ましい態様としては、複数の制限酵素部位を有するポリリンカーと、その上流にタバコ葉緑体由来の $rbcL$ 遺伝子と、その下流にタバコ葉緑体由来の $accD$ 遺伝子とからなる遺伝子が、タバコ葉緑体遺伝子と同一性を有する遺伝子であるベクターが挙げられる。ここで、同一性を有するとは、ハイストリンジェントな条件において、約80%以上、好ましくは約85%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有することをいう。なお、ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM程度、好ましくは約19~20mM程度で、温度が約50~70℃程度、好ましくは約60~65℃程度の条件をいう。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃程度の場合が最も好ましい条件である。上記ベクターのさらに好ましい態様としては、ポリリンカーが配列番号9で表される塩基配列からなるベクターが挙げられる。中でも、配列

番号8の396-3328に位置する塩基配列からなる遺伝子を有するベクターがより好ましい。

【0021】上記ベクターは、上述したような自体公知のクローニングベクターに、複数の制限酵素部位を有するポリリンカー、好ましくは配列番号9で表される塩基配列の遺伝子と、その上流にタバコ葉緑体由来の $rbcL$ 遺伝子と、その下流にタバコ葉緑体由来の $accD$ 遺伝子とを挿入することにより得られる。ここで、該ベクターは、複数の制限酵素部位を有するので、上記目的の遺伝子またはそれを含む遺伝子が挿入しやすいという特長がある。

【0022】上記ベクターには、タンパク質の発現に有利である1または複数の因子、例えばアクティベーター（例えばトランス作用因子）、シャペロンおよびプロセッシングプロテアーゼをコードする1または複数の核酸配列も含み得る。また、本発明に係る上記ベクターは、選択された宿主細胞内で機能的であるいずれかの因子を有していてもよい。

【0023】上記ベクターとして最も好ましい態様として、pLD200が挙げられる。かかるベクターは、実施例に記載の方法で容易に作製することができる。また、pLD200プラスミドは、ブタペスト条約に基づいて、平成13年3月19日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県筑波市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）に受託番号FERM P-18261として寄託されている。

【0024】pLD200の模式図を図5に記載した。図5より明らかなように、pLD200は、公知のプラスミドであるpUC19（Messing J, Methods in Enzymology, 101: 20 (1983)）に、（a）配列番号9で表される塩基配列を有するポリリンカーと、（b）その上流にタバコ葉緑体由来の $rbcL$ 遺伝子と、（c）その下流にタバコ葉緑体由来の $accD$ 遺伝子とが挿入されている。また、pLD200の全塩基配列を配列番号8に記載した。上記ポリリンカーは配列番号8の2125-2145に位置する。配列番号8の396-2124と2146-3324とに位置する遺伝子がタバコ葉緑体由来の遺伝子であり、その1-395と3325-5581とに位置する遺伝子がpUC19由来の遺伝子である。

【0025】上記発現ベクターのより好ましい作成方法としては、pLD6のマルチクローニング領域のSphIとEcoRIに挟まれた部位に、タンパク質をコードする遺伝子を挿入して遺伝子組換え体を作製し、ついで遺伝子組換え体をクローニングした後、該遺伝子組換え体からNotIおよびSalIを用いて構築遺伝子と識別遺伝子とを有する遺伝子を切り出し、該切り出した遺伝子をpLD200のポリリンカーのNotIとSalIに挟まれた部位に挿入するという方法が挙げられる。

【0026】このようにして作製された上記発現ベク

ーを宿主細胞に導入し、形質転換体を作製する。このとき、宿主細胞としては、植物細胞が好ましく、葉緑体がより好ましく、タバコ葉緑体がさらに好ましい。このように、植物細胞を宿主細胞として用いることにより、上述のように発現したタンパク質の精製過程での毒素の混入を防ぐことができ、また、タンパク質発現のためのコストも安いという利点がある。中でも、葉緑体を宿主細胞として用いることにより、上述のように導入した遺伝子がコードするタンパク質を高発現させることができ、さらに導入した遺伝子の花粉を介した環境への飛散を防ぐことができる等の利点がある。

【0027】該発現ベクターの宿主細胞へ導入して形質転換する方法としては、公知方法を用いてよい。例えば、該発現ベクターを金またはタングステンの極めて細かい粒子にまぶし、この該発現ベクターの付着した粒子を火薬または高压ガスで宿主細胞に打ち込み該発現ベクターを導入するというパーティクルガン法などが挙げられる。中でも、高等植物の葉緑体への遺伝子導入系はパーティクルガンによる手法 (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P., Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8526-8530 (1990)) または、PEGによる手法 (Golds, T., Maliga, P., and Koop, H.-U., Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum*. *Bio/Technol.*, 11, 95-97 (1993)) を用いるのが好ましい。

【0028】本発明に係る上記形質転換葉緑体を有する植物は、自体公知の方法によって得ることができる。ここで、上記植物は特に限定されないが、高等植物が好ましく、タバコがより好ましい。ついで、該植物をその植物に応じた自体公知の条件で生育させ、該植物体から自体公知の方法によって目的とするタンパク質を精製する。タンパク質の精製は、自体公知の分離・精製方法を適切に組み合わせて行うことができる。これら公知の分離、精製方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法もしくはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。このようにして、例えば薬理活性を有するタンパク質や工業用酵素などの有用タンパク質を大量に製造することができ、かつ大腸菌による発現系のように発現したタンパク質の精製過程で毒素の混入は実質上認められないという利点がある。さらに、動物細胞を用いた発現系よりも、低コスト・低エネルギーで目的のタンパク質を製造できるという利点もある。

【0029】なお、上記の遺伝子工学または生物工学の基本操作については、市販の実験書、例えば、1982年発行のモレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)、1989年発行のモレキュラー・クローニング第2版 (Molecular Cloning, 2nd ed.) コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) 等に記載された方法に従って容易に行うことができる。

【0030】

【実施例】〔工程1；pLD6の作製〕タバコ葉緑体由来のpsbAプロモーターの下流に、配列番号7で表される塩基配列からなるマルチクローニング領域を置き、その下流にタバコ葉緑体由来のリボソームタンパク質rps16のターミネーター (Trp s 16) を配置したプラスミドを構築した。このマルチクローニング領域のうちSph I 部位のatgを開始コドンになるようにその上流9塩基目にリボソーム結合部位 (SD配列；図1に示した塩基配列の5'末端から数えて13番目から始まる5ヌクレオチドからなるセグメント) を置いた。これら構築前遺伝子群の上流に葉緑体形質転換体の選抜のための識別遺伝子群 (aadAカセット) を置いた。これら両遺伝子群はNotI-SalIで切り出されるようにした。こうして構築したベクターをpLD6と名付けた (図1)。より詳しい構築過程を図7～9に示す。pLD6構築の出発物であるpBluescript II SK(+) (Gene Bank Accession Number: X52328) は、Stratagene社から購入した。また、図8の合成DNAは、DNA合成機model 392 (パーキン・エルマー株式会社製) を用いて化学合成した。

【0031】〔工程2；遺伝子組換え体の作製〕レポーター遺伝子としてGFPを用い (Sidorov, V.A., Kasten, D., Pang, S.-Z., Hajdukiewicz, P.T.J., Staub, J.M., and Nehra, N.S., Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J*, 19, 209-216 (1999))、該GFPをコードする遺伝子を、pLD6のマルチクローニング領域 (図1で塩基配列が記載されている部位) のSphIとEcoRIとで挟まれた部分に挿入した。かかる遺伝子組換え体が大腸菌の中に導入し、該大腸菌をスペクチノマイシンを添加したLB培地で37℃下16時間培養し、かかる遺伝子組換え体が入導された大腸菌を選択した。選択された大腸菌をLB培地で37℃下16時間培養し、培養後遠心分離をし、菌体を集菌し、常法にしたがって遺伝子組換え体 (プラスミドDNA) を精製した。なお、LB培地1L中の組成は、10gトリプトン、5g酵母エキス、5gNaClである。

【0032】〔工程3；pLD200の作製〕またNotI上流とSalI下流にタバコ葉緑体ゲノムのrbcL遺伝子とaccD遺伝子をふくむタバコ葉緑体遺伝子の相同配列 (配列

番号8の396-3328に位置する塩基配列)を導入したベクターpLD200を構築した(図5)。より詳しい構築過程を図6に示す。pLD200構築の出発物であるpUC19 (Gene Bank Accession Number: L09736)は、Messing J, Methods in Enzymology, 101: 20 (1983)の著者から分譲を受けた。また、図6の合成DNAは、DNA合成機model 392 (パーキン・エルマー株式会社製)を用いて化学合成した。

【0033】〔工程4; 発現ベクターの作製〕工程2で得られた遺伝子組み替え体(精製DNA)を、NotIとSalIで消化した。また、pLD200もNotIとSalIで消化し、ポリリンカー(図6で塩基配列が記載されている部位のうち5'末端から数えて5番目から始まる21ヌクレオチドからなるセグメント)のNotIとSalIとで挟まれた部分に、前記遺伝子組み替え体(精製DNA)のNotIとSalIとの消化物を挿入した。このようにして、本発明に係る発現ベクターを作製した。

【0034】〔工程5; 形質転換葉緑体の作製〕得られた発現ベクターを、タバコ葉緑体に導入し、形質転換葉緑体を作製した。タバコ葉緑体形質転換は既知の方法(Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P., Stable transformation of plastids in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8526-8530 (1990))によった。

【0035】葉緑体形質転換体の外観は野生種と同様のものだった(図2)が、蛍光顕微鏡下で観察した結果、野生種では見られないGFP由来の強い蛍光が見られた(図3)。また、この形質転換体からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEを行ったところGFPに対応する分子量の濃いバンドが確認された(図4)。このバンドの濃さのデンストメトリーから、その発現総量は全可溶画分の20%程度であった。

【0036】

【発明の効果】本発明に係る植物体を用いた異種タンパ

ク質の発現系を用いれば、大腸菌を用いた異種タンパク質の発現系の場合とは異なり、発現したタンパク質の精製過程での毒素の混入がないという利点がある。その上、植物は光合成により生育するため植物体育成のためのエネルギーの投入が少なく済み、その結果として製品(タンパク質)が安価に製造できるという利点がある。

【0037】従来の遺伝子組換え技術の懸念として、人工的に操作を加えた遺伝子による環境汚染がある。これは、導入した人工改変遺伝子が交雑、交配等により環境へ拡散していくことに対する懸念である。このため遺伝子組換えの際の生物的封じこめが強調されてきている。本発明においては、好ましい態様として葉緑体へ遺伝子を導入しタンパク質を発現させる。かかる葉緑体への遺伝子導入は、葉緑体遺伝子が母性遺伝することから、自然現象における生物的封じこめにあたり、環境保全の観点からも本発明は有用である。

【0038】本発明においては、好ましい態様として上記のように葉緑体へ遺伝子を導入しタンパク質を発現させる。かかる葉緑体の遺伝子発現系は原核細胞型のため、大腸菌原核型微生物からの移行が容易にできる。その結果、現在大腸菌等で行われている異種タンパク質の大量発現系からの移行がすみやかに行えるという利点がある。

【0039】本発明に係るタンパク質の発現系は、例えば、医薬品等の生産、工業用酵素類の生産、ポリエステル、生分解性プラスチック、油脂、タンパク質、炭水素もしくはテルペンの生産、家畜飼料(タンパク質、脂質、炭水化物等の成分調節により、消化、吸収されやすい植物体を作り、これを直接食べさせる)、観葉植物等の品種改良、複合環境ストレス耐性植物の創成などに有用である。

【0040】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Research Institute of Innovative Technology for the Earth

<120> A system for expressing protein using plants

<130> DC01J356

<160> 9

<210> 1

<211> 4591

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221>

<222>

<223> pLD6

<400> 1

gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc 50

taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 100

gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	150
tcgcccttat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	200
ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	250
agtgggttac	atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	300
ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	350
tgtggcgagg	tattatcccg	tattgacgcc	gggcaagagc	aaactcggtcg	400
ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggg	tgagtactca	ccagtcacag	450
aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgcgtgc	500
ataaccatga	gtgataacac	tgcggccaac	ttactttctga	caacgatcgg	550
aggaccgaag	gagctaaccg	ctttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	600
ctcgccctga	tcgttgggaa	ccggagctga	atgaagccat	accaaacgac	650
gagcgtgaca	ccacgatgcc	tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	700
attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	ccggcaacaa	ttaatagact	750
ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	ggcccttccg	800
gctggctggg	ttattgctga	taaatctgga	gccggtgagc	gtgggtctcg	850
cggtatcatt	gcagcaactg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	900
ttatctacac	gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	950
atcgtgaga	taggtgcctc	actgattaag	catttggtaac	tgtcagacca	1000
agtttactca	tatatacttt	agattgatit	aaaacttcat	ttttaattta	1050
aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	caaaatccct	1100
taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	1150
aggatcttct	tgagatccct	tttttctgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	1200
caaaaaaacc	accgctacca	gcgggtggtt	gtttgcccga	tcaagagcta	1250
ccaactcttt	ttccgaaggt	aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	1300
tactgtcctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	ccaccacttc	aagaactctg	1350
tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	agtggctgct	1400
gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	1450
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	gggggggttc	tgcacacagc	1500
ccagcttgga	gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	1550
ctatgagaaa	gcgccacgct	tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggatatcc	1600
ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	cacgaggag	cttccagggg	1650
gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	cctctgactt	1700
gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggcggagcc	tatggaaaaa	1750
cgcagcaaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggcctttttg	tggccttttg	1800
ctcacatggt	ctttcctgcg	ttatcccctg	attctgtgga	taaccgtatt	1850
accgcctttg	agtgagctga	taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	1900
cagcgagtca	gtgagcgagg	aagcgggaaga	gcgccaata	cgcaaaccgc	1950
ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcagctggca	cgacaggttt	2000
cccgaactga	aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	tgagttagct	2050
cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcgtatgt	2100
tgtgtggaat	tgtgagcgga	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	2150
catgattacg	ccaagcgcgc	aattaaccct	cactaaaggg	aacaaaaagc	2200
ggagctccac	cgcggtggcg	gccgctctag	ttggattttg	tccccgcgcg	2250
tcgttcaatg	agaatggata	agaggctcgt	gggattgacg	tgagggggca	2300
gggatggcta	tatttctggg	agcgaactcc	gggcgaattt	gaagcgttg	2350
gatacagttg	tagggaggga	tccatggctc	gtgaagcggg	tatcgccgaa	2400
gtatcaactc	aactatcaga	ggtagttagc	gtcatcgagc	gccatctcga	2450
accgacgttg	ctggcgcgtac	atttgtacgg	ctccgcagtg	gatggcggcc	2500
tgaagccaca	cagtgatatt	gatttgcctg	ttacgggtgac	cgtaaggctt	2550
gatgaaacaa	cgcggcgagc	tttgatcaac	gaccttttgg	aaacttcggc	2600

```

ttccctgga gagagegaga ttctccgcgc ttagaagtc accattgttg 2650
tgcaacgaga catcattccg tggcgttata cagctaagcg cgaaactgcaa 2700
tttgagaaat ggcagegcaa tgacattctt gcaggtatct tcgagccagc 2750
cacgategac attgatctgg ctatcttget gacaaaagca agagaacata 2800
gcgttgectt ggtaggtcca gcggcggagg aactctttga tccggttceet 2850
gaacaggatc tatttgagge gctaaatgaa accttaacgc tatggaactc 2900
gccgcccagc tgggctggcg atgagcgaaa ttagtgctt acgttgctcc 2950
gcatttggtc cagcgcagta accggcaaaa tcgcgccgaa ggatgtcget 3000
gccgactggg caatggagcg cctgccggcc cagtatcagc ccgtcatact 3050
tgaagctaga caggettata ttggacaaga agaagatcgc ttggcctcgc 3100
gcgcagatca gttggaagaa ttgtccact acgtgaaagg cgagatcact 3150
aaggtagttg gcaaataact gcaggatcct ggcttagtct ataggaggtt 3200
ttgaaaagaa aggagcaata atcattttct tgttctatca agagggtgct 3250
attgctectt tcttttttct tttttattta ttactagta tttacttac 3300
atagactttt ttgtttacat tatagaaaaa gaaggagagg ttattttctt 3350
gcattlatte atgattgagt attctatttt gatattgtat ttgtttaaaa 3400
ttgtagaaat agaacttggt tctcttcttg ctaatgttac tatacttttt 3450
tgattttttt ttccaaaaa aaaatcaaat ttgacttct tcttatctct 3500
tatctttgaa tatctcttat ctttgaaata ataatatcat tgaaaataaga 3550
aagaagagct atattcgaag cttctacata caccttggtt gacacgagta 3600
tataagtcac gttatactgt tgaataacaa gccttcatt ttctattttg 3650
atgttagaaa aactagtgtg cttgggagtc cctgatgatt aaataaacca 3700
agatctaaaa ggagaaatta agcatgctct agatcgatga attcgcctt 3750
ccgaagcttg aaattcaatt aaggaaataa attaaggaaa tacaaaaagg 3800
gggtagtca tttgtatata actttgtatg acttttctct tctatttttt 3850
tgtatttctt ccttttctt ttctatttgt atttttttat cattgcttcc 3900
attgaattac tagtcgacct cgaggggggg ccggtaccc aattcgccct 3950
atagtgagtc gtattacgcg cgtcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt 4000
gactgggaaa accctggcgt taccacactt aatcgcttg cagcacatcc 4050
ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga gggccgcacc gatcgccctt 4100
cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat gggacgcgcc ctgtagcggc 4150
gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 4200
tgccagegcc ctagegcccg ctcccttcgc tttcttccct tctttctcg 4250
ccacgttcgc cggttttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta 4300
gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta 4350
gggtgatggt tcacgtatgt ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc 4400
ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact 4450
ggaacaacac tcaacctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat 4500
tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat 4550
ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgc ttacaattta g 4591

```

<210> 2

<211> 142

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> rrn promoter

<400> 2

```

ctagttggat ttgtccccc gccgtcgttc aatgagaatg gataagaggc 50
tcgtgggatt gacgtgaggg ggcagggatg gctatatctt tgggagcgaa 100
ctccgggcga atttgaagcg cttggataca gttgtaggga gg 142

```

<210> 3

<211> 805

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<223> aadA

<400> 3

gatecatggc tcgtgaagcg gttatcgccg aagtatcaac tcaactatca	50
gaggtagttg gcgtcatcga gcgccatctc gaaccgacgt tgctggccgt	100
acatttgtac ggctccgcag tggatggcgg cctgaagcca cacagtata	150
ttgatttgct ggtaacggcg accgtaagcg ttgatgaaac aacgcggcga	200
gctttgatca acgacctttt ggaaacttcg gcttccccctg gagagagcga	250
gattctccgc gctgtagaag tcaccattgt tgtgcacgac gacatcattc	300
cgtggcggtta tccagctaag cgcgaactgc aatttggaga atggcagcgc	350
aatgacattc ttgcaggtat ctccgagcca gccacgatcg acattgatct	400
ggctatcttg ctgacaaaag caagagaaca tagcgttgcc ttggtaggtc	450
cagcggcgga ggaactcttt gatccggttc ctgaacagga tctatttgag	500
gcgctaaatg aaaccttaac gctatggaac tcgccgcccg actgggctgg	550
cgatgagcga aatgtagtgc ttacgttgtc ccgcatttgg tacagcgcag	600
taaccggcaa aatcgccgcg aaggatgtcg ctgccgactg ggcaatggag	650
cgcctgccgg cccagtatca gcccgtcata cttgaagcta gacagctta	700
tcttgacaaa gaagaagatc gcttggcctc gcgcgcagat cagttggaag	750
aatttgtcca ctacgtgaaa ggcgagatca ctaaggtagt tggcaataaa	800
ctgca	805

<210> 4

<211> 390

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> psbA terminator

<400> 4

gatectggcc tagtctatag gaggttttga aaagaaagga gcaataatca	50
ttttcttggt ctatcaagag ggtgctattg ctcttttctt tttttctttt	100
tatttattta ctagtatttt acttacatag acttttttgt ttacattata	150
gaaaaagaag gagaggttat tttcttgcat ttattcatga ttgagtattc	200
tattttgatt ttgtatttgt ttaaaattgt agaaatagaa cttgtttctc	250
ttcttgctaa tgttactata tctttttgat ttttttttcc caaaaaaaaa	300
tcaaattttg acttcttctt atctcttctc tttgaatctc tcttatcttt	350
gaaataataa tatcattgaa ataagaaaga agagctatat	390

<210> 5

<211> 133

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> psbA promoter

<400> 5

agcttctaca tacaccttgg ttgacacgag tatataagtc atgttatact	50
gttgaataac aagccttcca ttttctattt tgattttagt aaaactagt	100
tgcttgggag tccctgatga ttaaataaac caa	133

<210> 6

<211> 159

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<223> rps16 terminator

<400> 6
 agcttgaaat tcaattaagg aaataaatta aggaaataca aaaagggggg 50
 tagtcatttg tatataactt tgtatgactt ttctcttcta tttttttgta 100
 ttctctccct ttctttttct atttgatatt ttttatcatt gcttccattg 150
 aattactag 159
 <210> 7
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> multi-cloning regions
 <400> 7
 ccaagatcta aaaggagaaa ttaagcatgc tctagatcga tgaattcgcc c 51
 <210> 8
 <211> 5581
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <221>
 <222>
 <223> pLD200
 <400> 8
 tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg 50
 gagacgggtca cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg 100
 tcagggecgc tcagegggtg ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg 150
 cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata 200
 ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgcc attcgccatt 250
 caggctgcgc aactgttggg aaggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat 300
 tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta 350
 acgccagggt ttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt 400
 catgagttgt agggagggat ttatgtcacc acaaacagag actaaagcaa 450
 gtgttggtatt caaagctggg gttaaagagt acaaattgac ttattatact 500
 cctgagtacc aaaccaagga tactgatata ttggcagcat tccgagtaac 550
 tctcaacct ggagttccac ctgaagaagc aggggccgcg gtagctgccg 600
 aatctttctac tggatcatgg acaactgtat ggaccgatgg acttaccagc 650
 cttgategtt acaaagggcg atgctaccgc atcgagcgtg ttgttgaga 700
 aaaagatcaa tatattgctt atgtagetta ccttttagac ctttttgaag 750
 aaggttctgt taccaacatg ttacttcca ttgtaggtaa cgtatttggg 800
 ttcaaagccc tgcgcgtctt acgtctggaa gatctgcgaa tccctcctgc 850
 ttatgttaaa actttccaag gtccgcctca tgggatccaa gttgaaagag 900
 ataaattgaa caagtatggg cgtccctgtt tgggatgtac tattaaacct 950
 aaattggggg tatctgctaa aaactacggg agagccgttt atgaatgtct 1000
 tcgcggtgga cttgatttta ctaaagatga tgagaacgtg aactcacaac 1050
 catttatgcg ttggagagat cgtttcttat tttgtgccga agcactttat 1100
 aaagcacagg ctgaaacagg tgaaatcaaa gggcattact tgaatgctac 1150
 tgcaggtaca tgcgaagaaa tgatcaaaag agctgtatgt gctagagaat 1200
 tgggcgttcc gatcgtaatg catgactact taacgggggg attcaccgca 1250
 aatactagct tggctcatta ttgccagat aatgggtctac ttcttcacat 1300

ccaccgtgca atgcatgcgg ttattgatag acagaagaat catggtatcc	1350
acttccgggt attagcaaaa gcgttacgta tgtctggtgg agatcatatt	1400
cactctggta ccgtagtagg taaacttgaa ggtgaaagag acataacttt	1450
gggctttgtt gatttactgc gtgatgattt tgttgaacaa gatcgaagtc	1500
gcggtattta tttcaactcaa gattgggtct ctttaccagg tgttctaccc	1550
gtggttccag gaggtattca cgtttggcat atgcctgctc tgaccgagat	1600
ctttggggat gattccgtac tacagttcgg tggaggaaact ttaggacatc	1650
cttggggtaa tgcgccaggc gccgtagcta atcgagtagc tctagaagca	1700
tgtgtaaaag ctcgtaatga aggacgtgat cttgctcagg aaggtaatga	1750
aattattcgc gaggttgcga aatggagccc ggaactagct gctgcttggtg	1800
aagtatggaa agagatcgta tttaattttg cagcagtgga cgttttggat	1850
aagtaaaaac agtagacatt agcagataaa ttagcaggaa ataaagaagg	1900
ataaggagaa agaactcaag taattatcct tcgttctctt aattgaattg	1950
caattaaact cgccccaatc ttttactaaa aggattgagc cgaatacaac	2000
aaagattcta ttgcatatat ttgactaag tatatactta cctagatata	2050
caagatttga aatacaaaaat ctagaaaact aaatcaaaaat ctaagactca	2100
aatctttcta ttgttgtctt ggatcgcggc cgcgctagcg tcgacgatec	2150
ttaggattgg tatattcttt tctatcctgt agtttgtagt ttccctgaat	2200
caagccaagt atcacacctc tttctacca tccgttatat tgtccctttt	2250
gttccgtgtt gaaatagaac cttaatttat tacttatttt ttatttaa	2300
tttagatttg ttagtgatta gatattagta ttagacgaga ttttacgaaa	2350
caattatttt ttattttctt tataggagag gacaaatctc ttttttcgat	2400
gcgaatttga caccacatag gagaagccgc cctttattaa aaattatatt	2450
attttaaata atataaaggg ggttccaaca tattaatata tagtgaagtg	2500
ttccccaga ttccagaactt tttttcaata ctcacaatcc ttattagtta	2550
ataatcctag tgattggatt tctatgctta gtctgatagg aaataagata	2600
ttcaaataaa taattttata gcgaatgact attcatctat tgtattttca	2650
tgcaaatagg gggcaagaaa actctatgga aagatggtgg tttaattcga	2700
tgttgtttaa gaaggagtgc gaacgcaggc gtgggctaaa taaatcaatg	2750
ggcagtcctg gtcctattga aaataccaat gaagatccaa atcgaaaagt	2800
gaaaaacatt catagttgga ggaatcgtga caattctagt tgcagtaatg	2850
ttgattatth attcggcgtt aaagacattc ggaatttcat ctctgatgac	2900
acttttttag ttagtgatag gaatggagac agttattcca tctattttga	2950
tattgaaaat catatttttg agattgacaa cgatcattct tttctgagt	3000
aactagaaag ttctttttat agttatcgaa actcgaatta tcggaataat	3050
ggatttaggg gcgaagatcc ctactataat tcttacctgt atgatactca	3100
atatagttgg aataatcaca ttaatagttg cattgatagt tatcttcagt	3150
ctcaaactct tatagatact tccattataa gtggtagtga gaattacggt	3200
gacagttaca tttatagggc cgtttgtggt ggtgaaagtc gaaatagtag	3250
tgaaaacgag ggttccagta gacgaactcg cacgaagggc agtgatttaa	3300
ctataagaga aagtttctaat gatctcgacc tgcaggcatg caagcttggc	3350
gtaatcatgg tcatagctgt ttccgtgtgt aaattgttat ccgctcaca	3400
ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgcc	3450
taatgagtga gctaaactca attaatgctg ttgcgctcac tgcccgttt	3500
ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	3550
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgtt ctccgcttc ctcgctcact	3600
gaactcgtgc gctcggtcgt tcggtcgagg cgagcggtat cagctcactc	3650
aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga	3700
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg	3750
ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaa	3800


```

tcgaagetca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 3850
agcggtttcc ccctggaage tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg 3900
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 3950
ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 4000
ccaagetggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccca ccgctgcgcc 4050
ttatccggtg actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac acgacttate 4100
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 4150
gcggtgctac agagtctctg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga 4200
aggacagtat ttggtatctg cgtctctgctg aagccagtta ccttcggaaa 4250
aagagtgggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 4300
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 4350
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 4400
ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 4450
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat 4500
gagtaaacctt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat 4550
ctcagegate tgtctatttc gtccatccat agttgcctga ctccccgtcg 4600
ttagataaac tacgatacgg gagggcttac catctgccc cagtgcctga 4650
atgataccgc gagaccacg ctaccggct ccagatttat cagcaataaa 4700
ccagccagcc ggaaggggcg agcgagaaag tggctctgca actttatccg 4750
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg 4800
ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc attgctacag gcacgtggt 4850
gtcacgctcg tcgtttggta tggtctcatt cagctccggt tccaacgat 4900
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc 4950
ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 5000
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatecgtaa 5050
gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag 5100
tgtatgegge gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac 5150
cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt 5200
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg 5250
taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcacctttta ctttcaccag 5300
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 5350
taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat 5400
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga 5450
atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca ttccccgaa 5500
aagtgcacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaacctat 5550
aaaaatagge gtatcacgag gccctttcgt c 5581

```

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<221>

<222>

<223> polylinker

<400> 9

cgcgccgcg ctacgctga c

21

【図面の簡単な説明】

【図1】pLD6の模式図を示す。Pr r nはタバコ葉緑体由来のr r nプロモーターを表す。該r r nプロモーターは、配列番号2で表される塩基配列を持ち、配列

番号1中の2226-2368に位置する。aadAはスペクチノマイシン耐性遺伝子を表す。該スペクチノマイシン耐性遺伝子は、配列番号3で表される塩基配列を持ち、配列番号1中の2368-3173に位置する。

TpsbAはタバコ葉緑体由来のpsbAターミネーターを表す。該psbAターミネーターは配列番号4で表される塩基配列を持ち、配列番号1中の3175-3568に位置する。PpsbAはタバコ葉緑体由来のpsbAプロモーターを表す。該psbAプロモーターは配列番号5で表される塩基配列を持ち、配列番号1中の3569-3701に位置する。Trps16はタバコ葉緑体由来のrps16ターミネーターを表す。該rps16ターミネーターは、配列番号6で表される塩基配列を持ち、配列番号1中の3755-3913に位置する。塩基配列を記載した部位はマルチクローニング領域である。残りの部分(太線の部分)はpBluescript II SK(+)由来の遺伝子である。BglII、SphI、ClaIおよびEcoRIは制限酵素部位を表し、SDはSD配列(図1に示した塩基配列の5'末端から数えて13番目から始まる5ヌクレオチドからなるセグメント)を表す。

【図2】GFP遺伝子が発現している実施例で得られた葉緑体形質転換体を有するタバコの外観を示す。

【図3】GFP遺伝子が発現している実施例で得られた

葉緑体形質転換体を有するタバコの葉の蛍光像を示す。

【図4】実施例で得られた葉緑体形質転換体を有するタバコからタンパク質を抽出しSDS-PAGEを行った(パネルA)。また、GFP遺伝子の導入されていない野生型のタバコを用いて同様にSDS-PAGEを行った(パネルB)。全可溶タンパク質量の50%をしめるRuBisCO(rbcL+rbcS)に比較する量のGFPの蓄積が実施例で得られたGFP遺伝子導入タバコで観察された。なお、パネルMは分子量マーカーである。

【図5】pLD200の模式図を示す。rbcLはタバコ葉緑体由来のrbcL遺伝子を表す。accDはタバコ葉緑体由来のaccD遺伝子を表す。塩基配列を記載した部位のうち5'末端から数えて5番目から21塩基はポリリンカーである。太線の部分はpUC19由来の遺伝子である。NotI、NheIおよびSphIは制限酵素部位を表す。

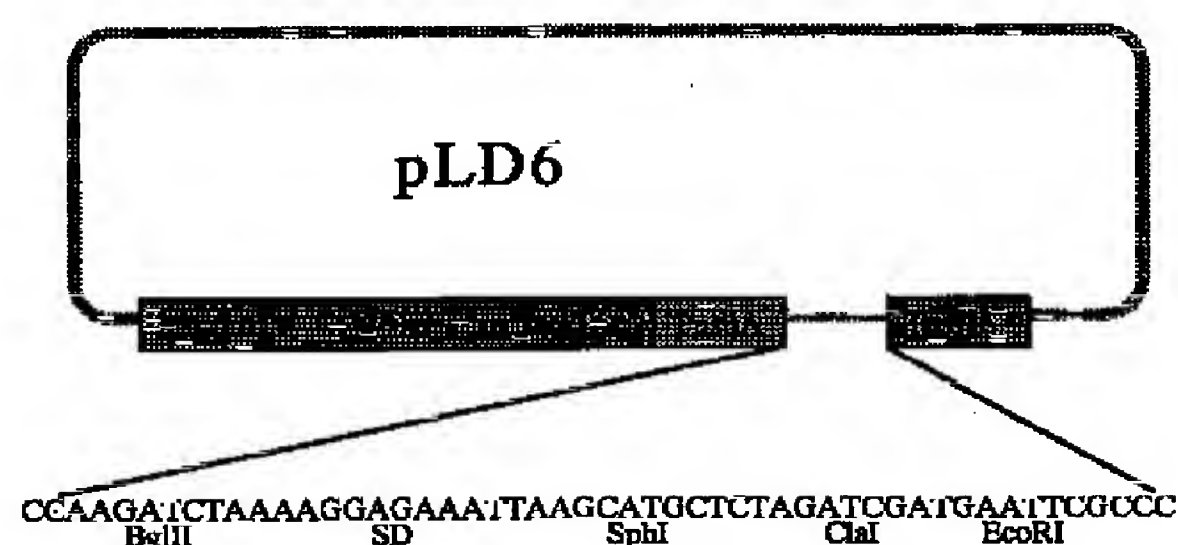
【図6】pLD200の構築過程を示す。

【図7】pLD6の構築過程のうち第1過程を示す。

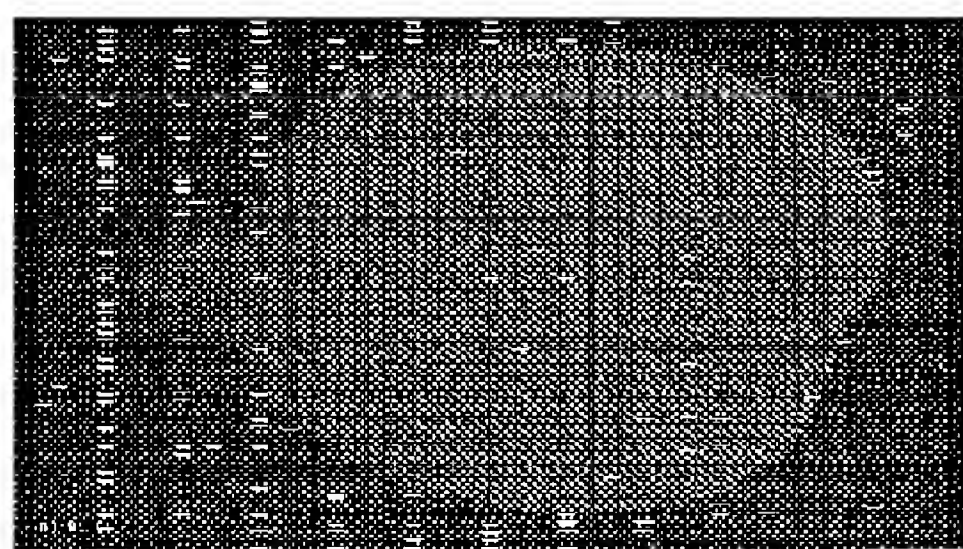
【図8】pLD6の構築過程のうち第2過程を示す。

【図9】pLD6の構築過程のうち第3過程を示す。

【図1】



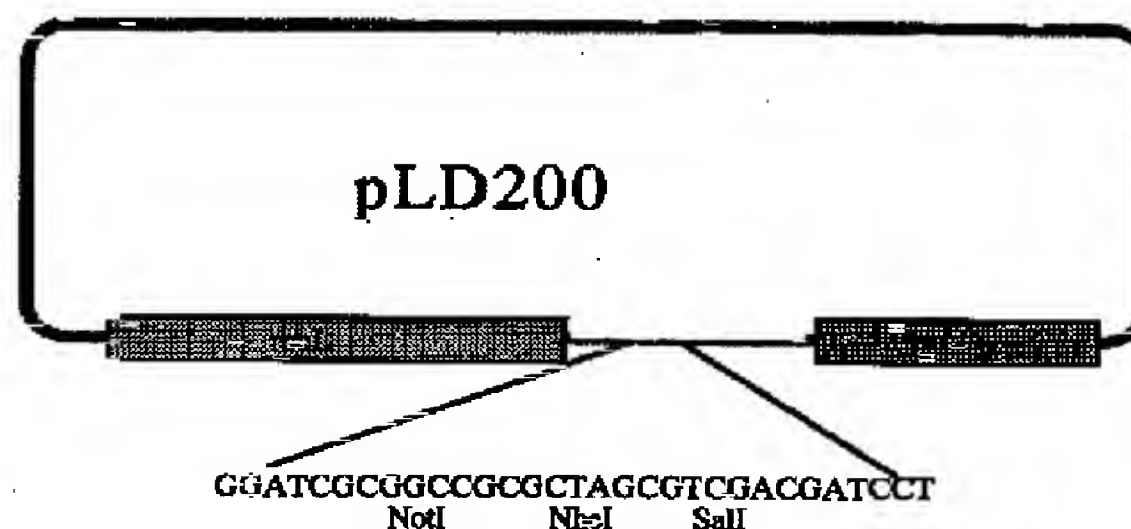
【図3】



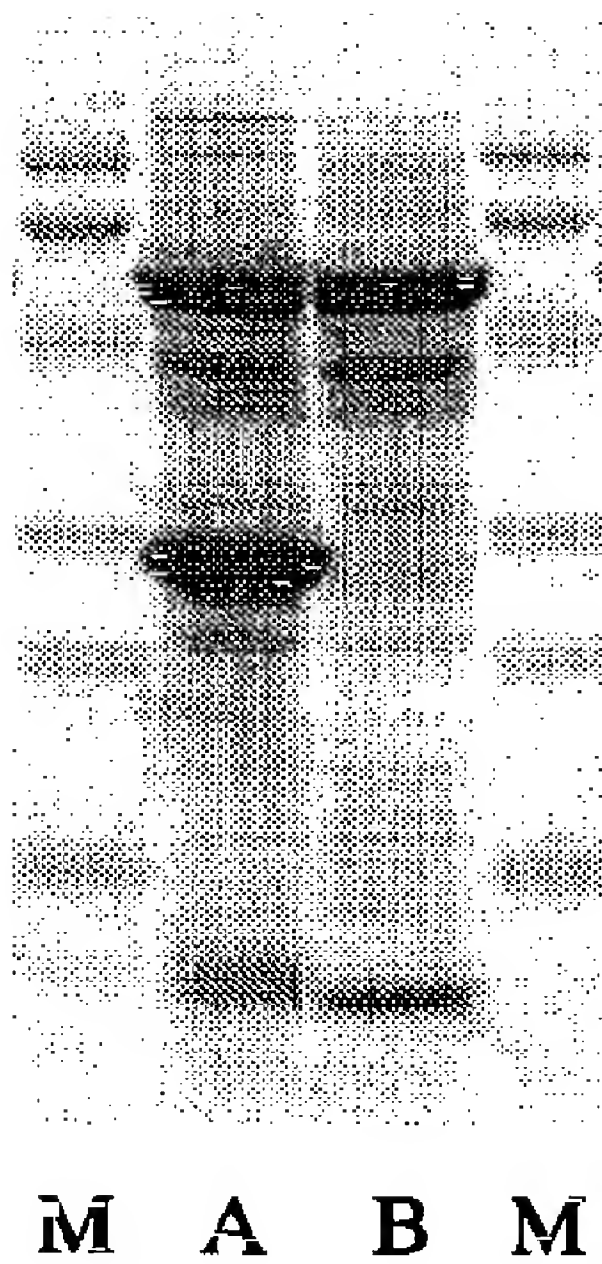
【図2】



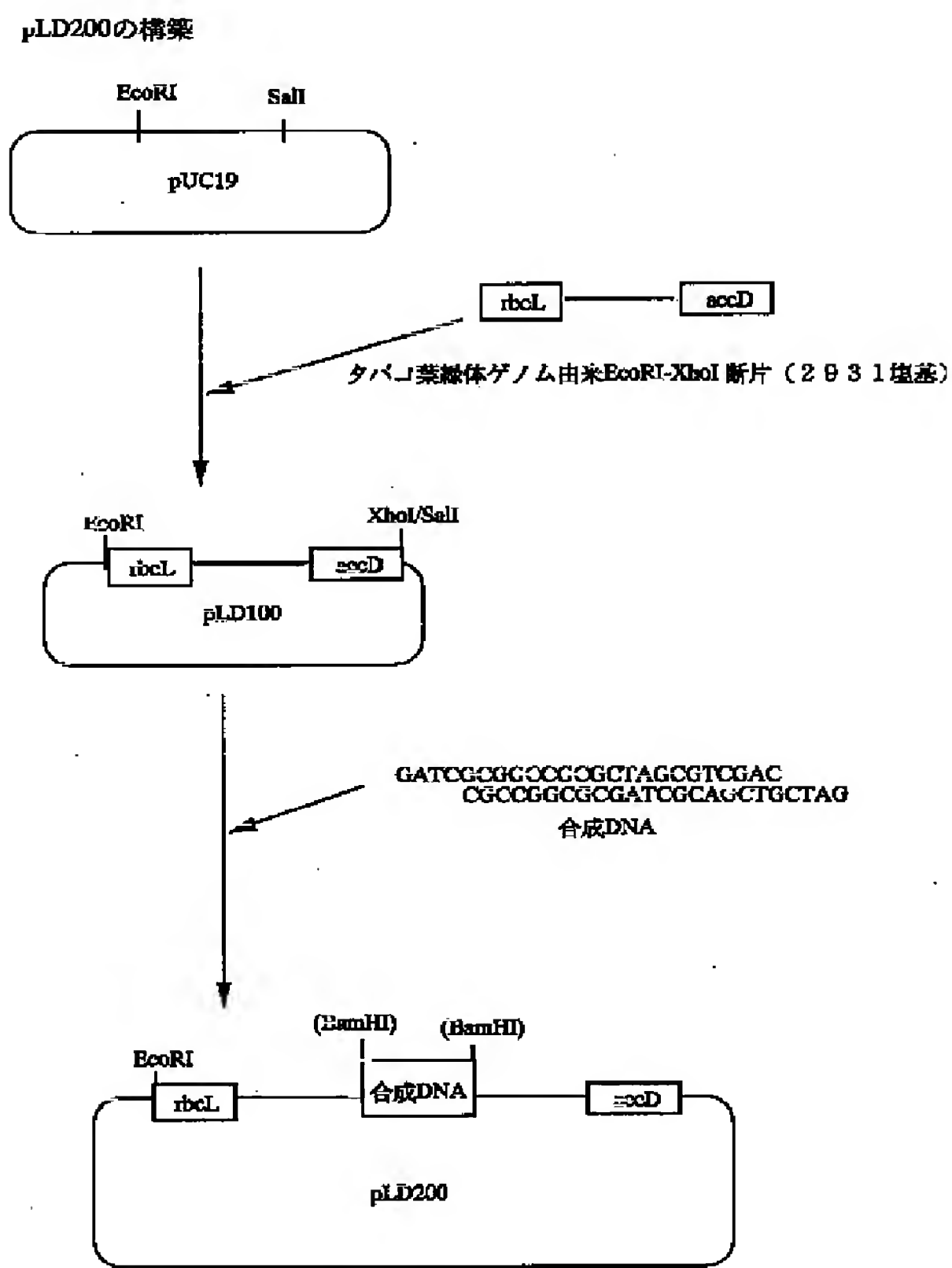
【図5】



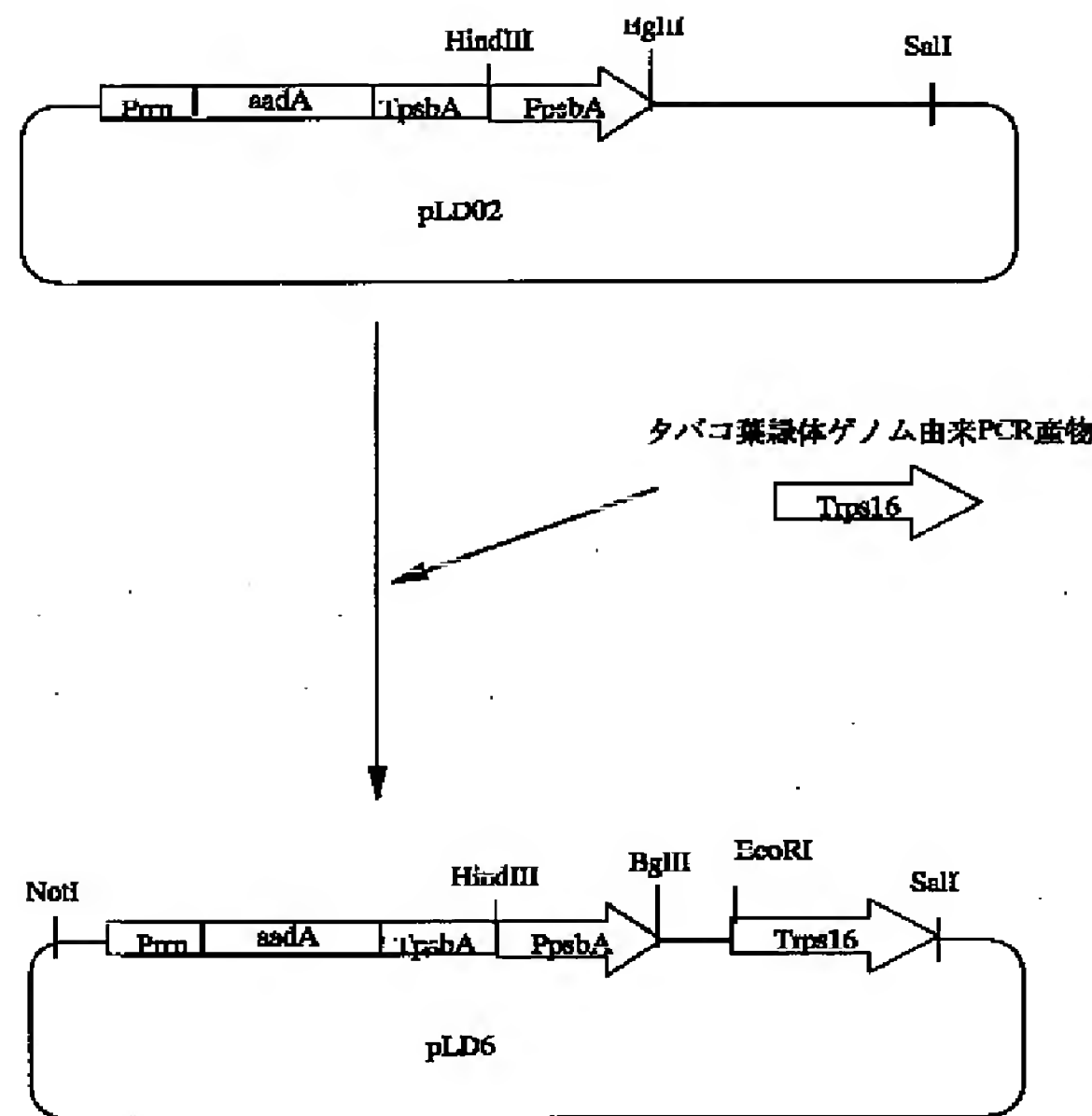
【図 4】



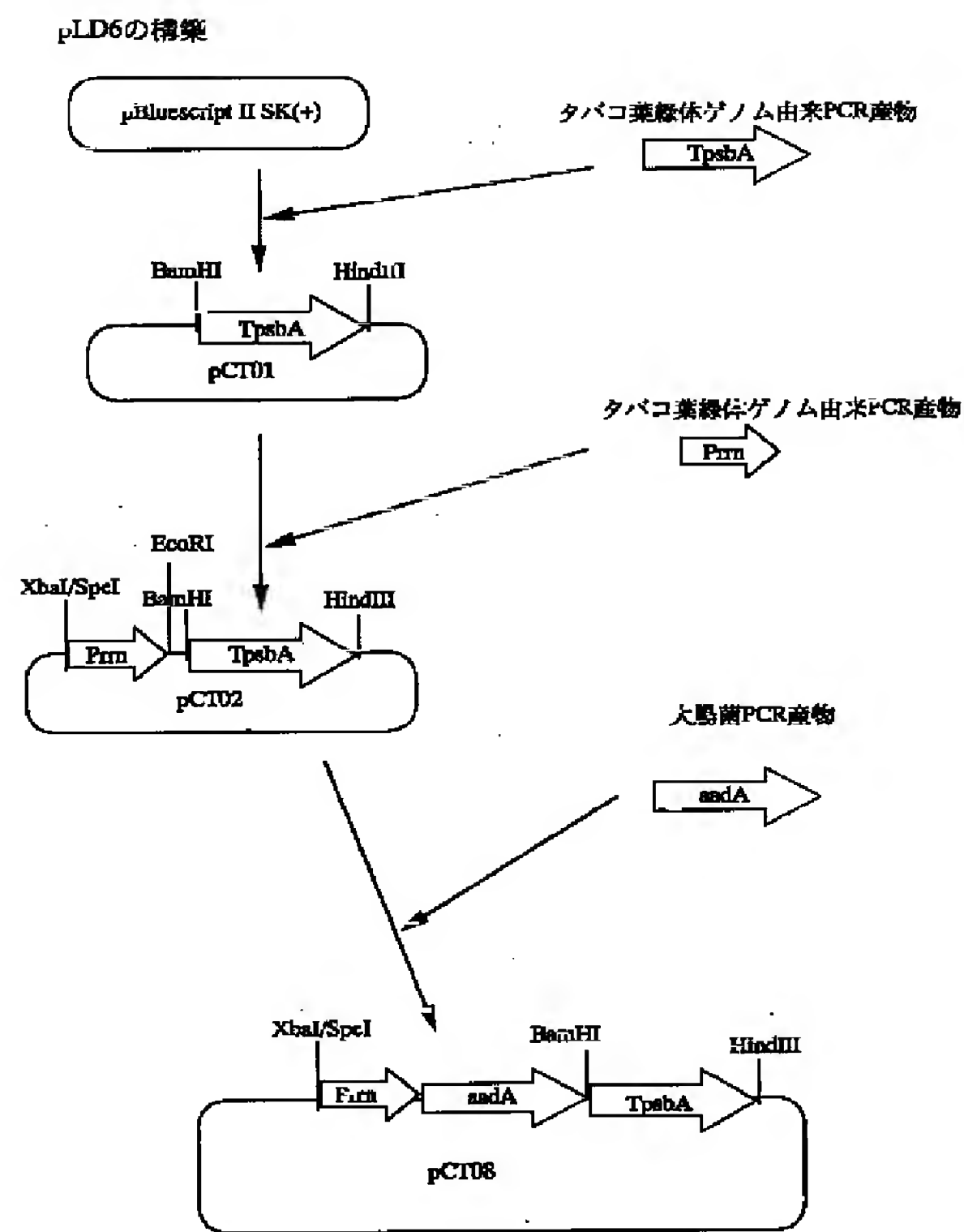
【図 6】



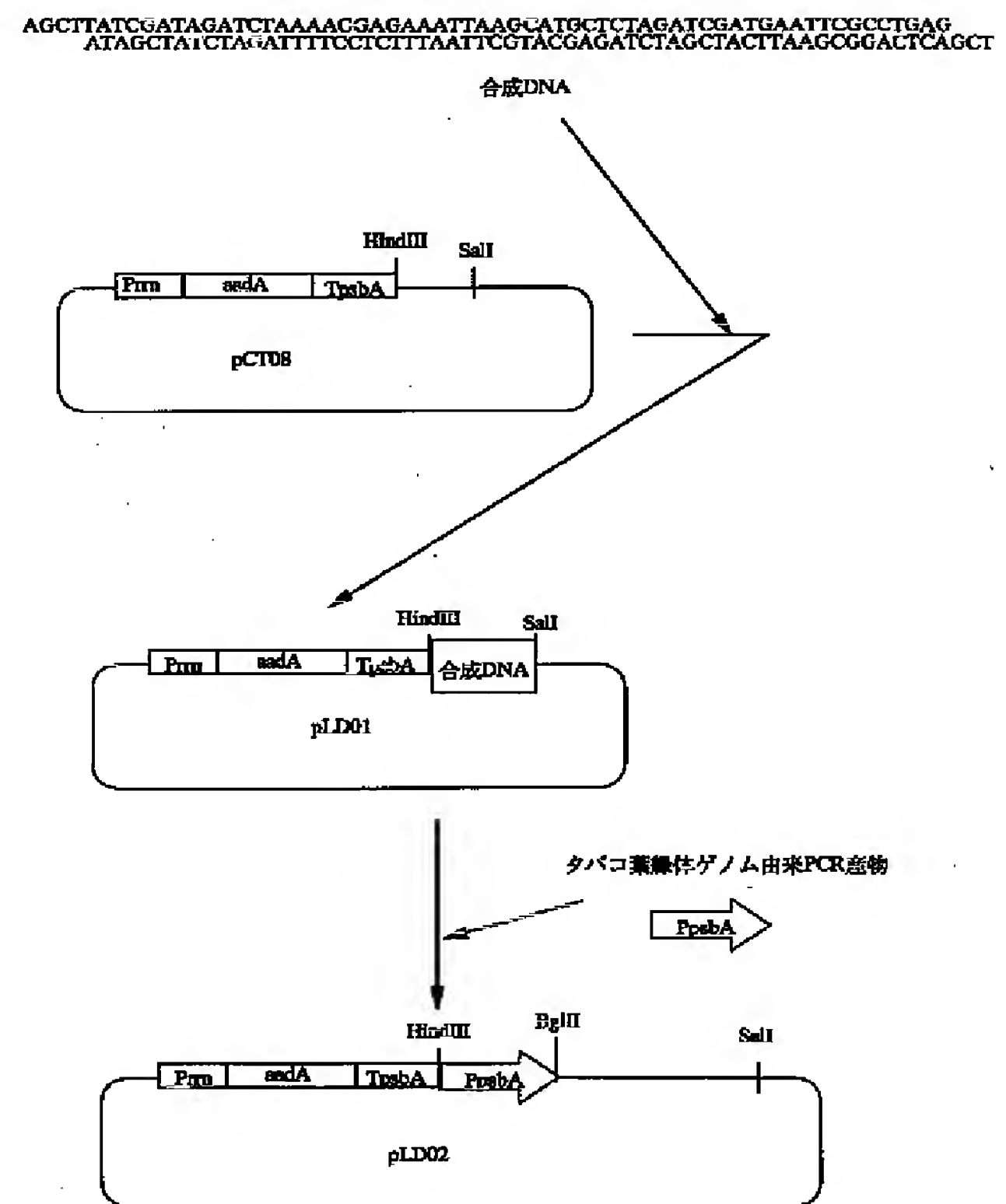
【図 9】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2B030 AB03 AD04 CA14 CA15 CA17
CA19
4B024 AA08 CA01 DA01 FA02 FA07
FA10 GA17 HA01
4B065 AA88X AA88Y AB01 AC14
BA02 CA24 CA43 CA44 CA53
4H045 AA10 BA10 CA30 EA05 EA07
EA20 FA74